

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-88456

⑪ Int.Cl.⁴

G 01 N 33/53
33/543
35/06

識別記号

庁内整理番号

T-7906-2G
C-7906-2G
8506-2G

⑬ 公開 昭和63年(1988)4月19日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 自動分析装置

⑮ 特 願 昭61-233831

⑯ 出 願 昭61(1986)10月1日

⑰ 発 明 者 佐 藤 剛

茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立製作所那珂工場
内

⑱ 発 明 者 三 村 智 憲

茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立製作所那珂工場
内

⑲ 出 願 人 株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

⑳ 代 理 人 弁理士 鶴 沼 辰 之

明 細 書

1. 発明の名称

自動分析装置

2. 特許請求の範囲

1. サンプルを収納する筒状部材からなり、その上部に最大径を有するヘッドを備えるプローブチップと、前記ヘッドの上面に挿入連結させ、前記プローブチップを各デスク上に移動させるとともに、プローブチップ内のサンプルを吐出する上下可動のアームと、所望のデスク上にて前記ヘッドの上端面を係止させるため順次小径となる溝を有する部材と、所望のデスク上にて前記ヘッドの下端面を係止させるため順次小径となる溝を有する部材とが備えられたことを特徴とする自動分析装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は自動分析装置に係り、特にB/F分離を必要とする酵素免疫測定の実効率の向上を図った自動分析装置に関する。

(従来の技術)

B/F分離法(酵素免疫測定法、第2版、p30-49、1982年12月、医学書院発行、参照)は、抗原抗体反応の結果、抗原と抗体が結合して生じた結合型の部分(bound.B)と、結合していない遊離型の部分(bound.F)とを物理的に分離して、標識酵素の酵素活性を測定し、試料中の抗原を定量化する技術であるが、物理的分離操作が遠心および上清を捨てるという手間と時間のかかるものであるとともに、効率よく全自動的に測定することは生化学的分析項目に比べて遅れていた。

このB/F分離による手法は、低分子から高分子まで適用範囲が広く有益な方法であるが、分離の方法にもいろいろあり、以下に説明する。

- 1) 第1抗体固相法すなわち、抗体を支持体に結合させ、固相の状態にしておく。この時、固相化した抗体の生物学的活性は保たれており、チューブそのものに固定化したものや、球形、板状の固体を使う場合がある。次に、酵素を結合させた抗原(酵素標識抗原)を加えるが、酵素標識

抗原量を抗体に対してやや過量にしておけば、その一部は抗体と結合 (bound) し、他の部分は抗体と結合しない (free) 状態で残る。ここで free は溶液中にあるが、bound は支持体に着いているので、両者を遠心によつて分離することができ、どちらかの酵素活性を測定する。この時、標識抗原の量を一定にして標識していない抗原を加えると、抗体量は一体なので、非標識抗原が結合した分だけ、酵素標識抗原の抗体への結合量が少なくなる。ここで、非標識抗原の量を変えて、上記操作をそれぞれ行い、酵素活性を測定する。そして横軸に非標識抗原 (標準抗原) の量を取り、縦軸に酵素活性を取つて検量線を作成する。次に、検体を標準抗原の代りに加えて、同様に抗原抗体反応を行い、酵素活性を測定すれば、上記検量線から検体中の抗原の量が分る。

2) 二抗体法

本法も上述の方法と原理的には同じ競合反応であるが、bound と free との分離法が異なつて

〔問題点を解決するための手段〕

このような目的を達成するため、本発明は、サンプルを収納する筒状部材からなり、その上部に最大径を有するヘッドを備えるプローブチップと、前記ヘッドの上面に挿入連結させ、前記プローブチップを各ディスク上に移動させるとともに、プローブチップ内のサンプルを吐出する上下可動のアームと、所望のデスク上にて前記ヘッドの上端面を係止させるため順次小径となる溝を有する部材と、所望のデスク上にて前記ヘッドの下端面を係止させるため順次小径となる溝を有する部材とを備えるようにしたものである。

〔作用〕

自動分析装置にあつて、アームによつてサンプルを各デスク上に移動させる場合、前記サンプルをアームから切り離した状態でデスク上に比較的長時間静置させる場合、あるいは、そのためにサンプルをアームから切り離す場合が主としての作業となる。前記アームはコンピュータ制御によつて適切な時期に上下動し得ることから、プローブ

いる。ここでは、抗体 (第1抗体) と酵素標識抗原、標準抗原あるいは検体は、液相の状態で反応させる。そこで、bound と free とを分離するために、第1抗体に対する抗体 (第2抗体) を一定量添加して凝集塊を作らせ、遠心によつて沈殿 (bound) と上清 (free) に分離する。その他は第1抗体固相法と同様であり、検量線から検体中の抗原の量が分る。

3) 二抗体固相法

これは、第2抗体を固相化したもので、軽い遠心で容易に free を除くことができる。他は上述の手法と同様である。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかし、従来の技術にあつては、処理効率の点、プローブチップ中に試薬を充填させる点、および全自動化の点について配慮がなされていないものであつた。

本発明の目的は、特殊なサンプルプローブを用いることによつて、処理効率の向上を図つた自動分析装置を提供するにある。

チップに上述のようなヘッドを設け、このヘッドの上下端を係止する部材を所望のデスク上に設けることによつて達成される。

すなわち、サンプルが所定のデスク上に来た際にはヘッドの上端面を係止する順次小径となる溝を有する部材が設けられている。この溝はアームによつてサンプルが移動する方向と一致して位置づけられている。前記アームが上方に移動すればヘッドは前記部材によつて係止され、アームはヘッドから切り離される。また、前記サンプルを所定のデスク上に静置させておく場合には、ヘッドの下端面を係止する順次小径となる溝を有する部材が設けられており、前記サンプルは前記部材によつてそのままの位置を保持することができる。

このようなことから、前記アームの移動に関し、その軌跡および移動の際の時間的要素を正確に予め設定しておれば、自動的に処理効率の高い自動分析装置を得ることができるようになる。

〔実施例〕

以下、図面を用いて本発明による自動分析装置

の実施例について説明する。

第1図は本発明による自動分析装置の全体構成を示す説明図である。同図において、血清サンプリング機構およびブローブアーム1、試薬ピペティング機構およびブローブとそのアーム2、サンプルディスク3、サンプルディスクフタ4、反応ディスク5、試薬ディスク6、ブローブチップディスク7、ブローブダストボックス8によつて構成されている。

第2図は前記ブローブアーム1の詳細を示す図で、このブローブアーム1はCPU15の制御により上下および左右に動作することができ、さらにシリンジ13によつてサンプルを吸引あるいは吐出することができるようになっていゝ。なお、図中、符号9はサンプルブローブチップを示している。

前記サンプルブローブチップ9は、第3図に示すように、前記ブローブアーム1との結合部となるチップヘッド16の内側に細い縦溝17を切つてすべりにくくしたポリプロピレン製からなり、

領域で再現性よくかつ効率よく結合されている。固相化用の緩衝液は、炭酸-重炭酸緩衝液(0.05 M, pH 9.6)であり、抗体をこの緩衝液で1~10 μ g/mlに希釈して加え、4℃で一昼夜放置(室温で2時間位でも可)し、吸着させたものである。

第4図は、ブローブチップ9、サンプルカップ11、それぞれのホール21、22のサンプルディスク3上の位置関係とディスクフタ4を示す図である。サンプルディスク3においては、カップ11とチップ9を置くホールが溝23でつながっており、さらにこれらを覆うフタ4にも一ヶ所のみサンプルディスク3に対応して穴25があいている。この穴25はカップホール21と溝23に対応した所ではそれぞれ同様の大きさであり、チップ9に対応した所では、チップヘッド16の直径より25%ほど小さくなつており、フタ4とチップヘッド16との隙間が1mm程度に接近している。

次に、このように構成した自動分析装置の動作

先端から1/3ぐらいの位置に、前記アームが外れた際に中のサンプルがこぼれないように、くびれ18を有し、そのくびれ18より上方に、抗体を物理的あるいは化学的に結合させた樹脂10が充填されている。また、前記チップヘッド16と本体部分との境界部にもくびれ19が形成されており、サンプルの蒸発が少なくなるようにしている。

なお、前記チップヘッドは他の部分よりもその径が大きく形成され、その上部には、薄いポリプロピレン製からなるシール20が施こされており、これには十字形にミシン目が形成され、前記アーム1が装着されるとき前記ミシン目が前記アーム1の挿入によつて切れることによつてシール20の各片が内側に曲がり、前記アーム1が離れたときに、内側に曲がつていたシール20がその弾力により元の状態に近い所まで戻り、蓋を形成するようになるようになっていゝ。

樹脂への抗体の結合は、たとえば物理的吸着によるもので、ポリスチレンの粒子の表面に高pH

を第5図①~⑤を用いて説明する。

- ① サンプリグブローブアーム1がブローブチップディスク7上に回転しながら移動し、このディスク7上のブローブチップ9の上で静止する(第5図①)。
- ② アーム1が下方へ移動して、チップヘッド16のミシン目入りのシールを破いて前記アーム1がブローブチップ9に連結する(第5図②)。
- ③ ブローブチップ9は、ディスク7上の穴にそのチップヘッド16の部分がディスク7上に乗るように装着されたものである。そして、ブローブチップ9はアーム1とともに上方に移動する。前記ブローブチップ9の本体は前記チップヘッド16より小径に形成されているため、ディスク7から容易に外れるようになっており、前記ブローブチップ9は、その後、サンプルディスク3方向に回転する(第5図③)。
- ④ サンプルディスク3のフタ4の穴の最も幅の広い部分の下には、試料の入ったサンプルカップ

11が位置づけられている。前記アーム1はサンプルカップ11上にて静止し、前記試料を吸引するためプローブチップ9の先端が下方へ移動し、試料中に入る(第5図④)。

⑤プローブチップ9は試料を吸引する(第5図⑤)。

⑥その後、アーム1はサンプルカップ11上の位置に戻り、フタ4の幅の狭い方向へ、前記カップ11が下方に存在しなくなる位置まで移動する。そして、プローブチップ9のヘッド16が前記フタ4よりわずかに下になるまで動くので、前記チップ9はサンプルディスク3上の穴の中を動くことができるようになる(第5図⑥)。

⑦その後、フタ4の穴の最も幅の狭い部分まで回転し、一時静止する(第5図⑦)。

⑧この後、アーム1は上方へ移動するが、この位置でのフタ4の穴はチップヘッド16の径より小さいので、アーム1のみ上方へ移動し、プローブチップ9はサンプルディスク3上に残存する。この際、前記アーム1によつて折りたたま

れていたチップヘッド16上のシール16はその弾力によつて元に戻り、蓋をすることとなる(第5図⑧)。

⑨抗原-抗体反応をプローブチップ9中で行わせるために所定の時間静置させる。

その後、前記アーム1が再度、プローブチップ9上に移動し、下方へ移動してプローブチップ9との連結を行なう(第5図⑨)。

⑩そのままの高さで、アーム1は、サンプルカップ11方向へ逆戻りし、前記カップ11に当たる前に、上方へ移動する(第5図⑩)。

⑪完全にサンプルディスク3上にプローブチップ9が上昇した時点で静止し、反応ディスク5方向へ回転する(第5図⑪)。

⑫反応ディスク5の反応容器上で静止し、チップ9の先端が前記反応容器の底に当たらないように下方へ移動する。静止した後、チップ9中の反応液を吐出する(第5図⑫)。

⑬吐出後、アーム1は回転によつて反応ディスク5に当たらない所まで上方に移動し、チップ

廃棄用のチップダストボックス8上へ回転し、ボックスフタのホール上で静止する。ホールの最も幅の広い位置で、下方へ動き、チップヘッド19がフタより下になった時点で静止する(第5図⑬)。

⑭この後、ボックスフタのホールの最も幅の狭い位置まで回転し、その位置でアーム1は上方へ動く、上記⑦、⑧の工程中で述べたように、アーム1のみが上方へ移動し、チップ9はボックス内へ落下する(第5図⑭、⑮)。

その後、反応ディスク5では、反応容器中に試薬プローブが試薬を添加し、酵素反応とその測定が開始される。

本発明によれば、低分子から高分子まで扱えるheterogeneous EIAにおいて、分離操作を簡便にして全自動化を可能とし、また、レートアッセイ法を用いて酵素活性測定を行い、さらにfreeな標識抗原に着目しているので、効率向上の効果がある。

以下、5つの例を示した。

例1) フェリチンの測定

検試酵素: β -D-ガラクトシダーゼ

測定方法: 反応容器中にあるB/F分離後の試料に、緩衝液A*中に $1 \times 10^{-4} M$ 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを含む試薬を0.15 ml 加え、37℃、10分間静置しながら蛍光(450 nm, excitation: 360 nm)を測定する。

	自動化しない場合	本実施例
抗原抗体反応	6 hr	30'
遠心、上清の除去	20' - 30'	-
酵素活性測定	20'	10'

*: 0.1% BSA - 0.1 M NaCl

- 1 mM MgCl₂ - 0.1% NaN₃を含む
0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液
(pH 7.0)

例2) インシュリンの測定

検試酵素: β -D-ガラクトシダーゼ

測定方法: B/F分離後の試料の入っている反応

容器中に、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 0.1 ml を加え、37℃で3分間静置した後、基質溶液 (0-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシド 0.06 g を0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 100 ml に溶解する。) を0.1 ml 加え、37℃で10分間静置しながら420 nm の吸光度を測定する。

	自動化しない場合	本実施例
抗原抗体反応	3 hr	30'
遠心、上清の除去	20' - 30'	-
酵素活性測定	90'	20'

例3) コルチゾールの測定

標識酵素: アルカリフォスファターゼ

測定方法: B/F分離後の試料 (反応容器中) に基質溶液 (フェニルリン酸二ナトリウム 0.215 g 及び4-アミノアンチピリン 0.09 g を0.05 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 10.5)

37℃で、20分間静置しながら蛍光 (450 nm, excitation: 360 nm) を測定する。

	自動化しない場合	本実施例
抗原抗体反応	1 昼夜 (二抗体法)	40'
遠心、上清の除去	20' - 30'	-
酵素活性測定	90'	40'

・緩衝液 B: 10 mM リン酸ナトリウム溶液 (pH 7.0) に 0.1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% NaN₃, 0.1% 卵アルブミンを含む緩衝液。

例5) α-フェトプロテインの測定

標識酵素: ペルオキシダーゼ

測定方法: 反応容器中にある B/F分離後の試料に、基質溶液 (0-フェニレンジアミンをクエン酸緩衝液 (0.1 M クエン酸-0.2 M Na₂HPO₄ (pH 5.5), 0.02% H₂O₂ と 0.01% チメロサルを含む) に 3 mg/ml の割合で溶解したもの。) 0.25 ml を加え、

200 ml に溶解する。) を0.1 ml 加え、37℃で、30分間静置し、発色液 (フェリシアン化カリウム 0.38 g を取り、0.2 M ホウ酸溶液 200 ml に溶解する。) 0.1 ml を加え、500 nm で10分間吸光度を測定する。

	自動化しない場合	本実施例
抗原抗体反応	1 昼夜 (二抗体法)	40'
遠心、上清の除去	20' - 30'	-
酵素活性測定	90'	40'

例4) プロスタグランディン (PGF_{2α}) の測定

標識酵素: β-D-ガラクトシダーゼ

測定方法: 反応容器中にある B/F分離後の試料に、基質溶液 (N, N'-ジメチルホルムアミドに最終濃度 14.7 mM になるように、4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシドを溶解させたもの 0.34 ml を緩衝液 B・50 ml に加えたもの。) 0.3 ml を加え、

37℃で10分間静置しながら、492 nm の吸光度を測定する。

	自動化しない場合	本実施例
抗原抗体反応	1 昼夜 (二抗体法)	40'
遠心、上清の除去	20'	-
酵素活性測定	10' ~ 30'	10'

【発明の効果】

以上説明したように、本発明による自動分析装置によれば、特殊なサンプルプローブを用いることによつて、処理効率の向上を図ることができる。

4. 図面の簡単な説明

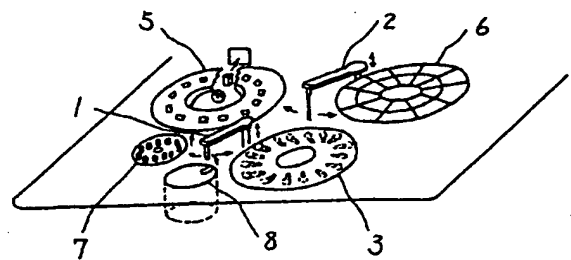
第1図は本発明による自動分析装置の一実施例を示す全体概略説明図、第2図は前記自動分析装置のアーム部の構成図、第3図は前記自動分析装置のプローブチップの構成図、第4図は前記自動分析装置のデスク上方における構成を示す図、第5図 (A), (B) は前記自動分析装置の動作を示す図である。

1…サンプリング機構、2…試液ピペッティング機構、3…サンプルディスク、4…サンプルディ

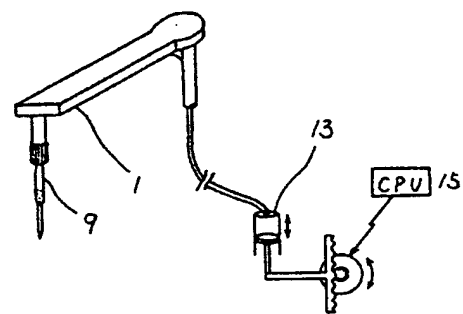
第 1 図

スクフタ、5…反応ディスク、6…試験ディスク、
7…プローブチップディスク、8…プローブダ
ストボックス、9…サンプルプローブチップ。

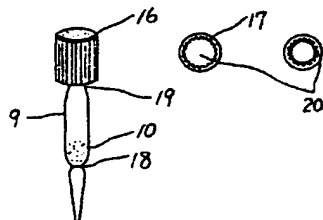
代理人 代理士 趙 沼 展 之



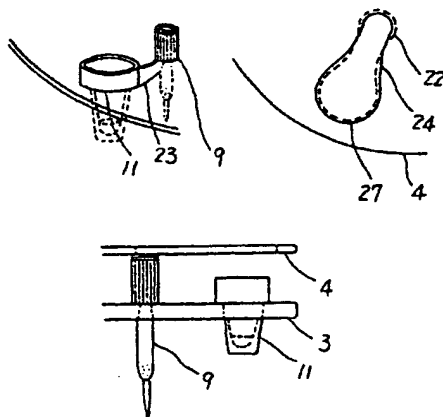
第 2 図



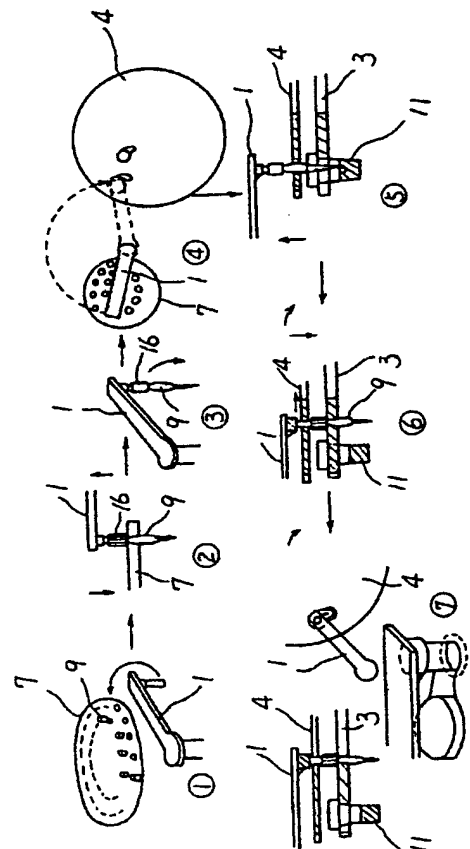
第 3 図



第 4 図



第 5 図
(A)



第 5 図
(B)

